

### UTILIZAÇÃO DA ORF53R COMO MARCADOR MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE RANAVIRUS

Thaís Camilo CORRÊA<sup>1,2</sup>, Loiane Sampaio TAVARES<sup>1</sup>, Bárbara Silva VIGNATO<sup>3</sup>, Isabela Benelli MORILHA<sup>1</sup>, Aline Takahashi FERRERO<sup>1</sup>, Marcelo Felisberto dos REIS<sup>1</sup>, Samara Rita de Lucca MAGANHA<sup>1</sup>, Silvia Helena Seraphin de GODOY<sup>1</sup>, Cláudia Maris FERREIRA<sup>3</sup>, Sabrina Ribeiro de ALMEIDA-QUEIROZ<sup>5</sup>, Andrezza Maria FERNANDES<sup>1</sup> e Ricardo Luiz Moro de SOUSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP

<sup>2</sup>Endereço: Av. Duque de Caxias Norte, 225 Campus Fernando Costa – USP, Pirassununga – SP – Brasil, CEP 13635-900. Departamento de Medicina Veterinária - Laboratório de Higiene Zootecnia. e-mail: thaiscorrea@usp.br

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP

<sup>4</sup>Instituto de Pesca – APTA – SAA, São Paulo – SP – Brasil

<sup>5</sup>Dizoo Serviços de Atividades Veterinárias EIRELI-ME

**Palavras chave:** FV3; *myristoylated membrane protein*; *Iridoviridae*; ranavirose; monitoramento.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Ranavirus* é responsável por doenças sistêmicas em peixes, anfíbios e répteis (CHINCHAR *et al.*, 2017). No Brasil, os relatos de surtos por ranaviroses ocorrem desde meados dos anos 2000 e têm aumentado sua ocorrência nos últimos anos, principalmente em criações comerciais de rã-touro. O gene MCP (*major capsid protein*) é o principal marcador utilizado no diagnóstico molecular de *Ranavirus*. Entretanto, outros marcadores moleculares têm sido explorados para complementar o diagnóstico e ampliar o conhecimento filogenético das cepas identificadas em surtos. Dessa forma, o gene que codifica a proteína *myristoylated membrane protein* (MMP), que na espécie *Frog virus 3* (FV3) é denominada como ORF53R, foi selecionado para ser testado como marcador molecular, uma vez que, conforme estudos *in vitro* com FV3 indicam, esta proteína é essencial para a replicação viral, desempenhando um papel crítico na formação de novos vírions (WHITLEY *et al.*, 2010). Assim, o objetivo deste trabalho foi testar a utilização e eficiência da ORF53R no diagnóstico molecular, bem como na reconstrução filogenética, de *Ranavirus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

A sequência nucleotídica do gene ORF53R da espécie tipo FV3 (AY548484) foi utilizada para desenhar quatro *primers* (Tabela 1). Em seguida, foi realizada a clonagem deste

gene, a partir de isolado brasileiro FV3-símile, com o auxílio do vetor pGEM-T Easy Vector Systems. Com a sequência de 1569pb obtida, foi realizada a dedução de aminoácidos, sendo a sequência de 522 aminoácidos comparada com a de outras espécies do gênero *Ranavirus* no programa Jalview. Em seguida, os dois pares de *primers* do gene MMP foram utilizados em reações de PCR, assim como o par de *primers* para MCP2 (MARSH *et al.*, 2002) também foi empregado, para a detecção de DNA de vírus do gênero *Ranavirus*, com o intuito de se avaliar a eficiência destes marcadores em amostras clínicas de rã-touro provenientes de criadouros do Estado de São Paulo (CEUA FZEA n° 1833201117).

Os produtos de PCR das amostras positivas foram sequenciados para dois fragmentos: MMP1 e MCP2. As sequências obtidas foram analisadas no programa BioEdit, sendo a similaridade entre estas sequências e as homólogas da família *Iridoviridae* verificada no BLAST (NCBI), utilizando-se o ClustalW (BioEdit) para a obtenção do alinhamento múltiplo. Para a reconstrução filogenética, foram utilizadas 25 sequências dos dois marcadores concatenadas, sendo quatro amostras obtidas nesse estudo e as demais de espécies e cepas de iridovírus depositadas no GenBank. A análise pelo método de máxima verossimilhança foi realizada no programa MEGA X, utilizando-se o melhor modelo de substituição (K2+G+I) baseado no Bayesian Information Criterion (BIC), adotando-se 1000 pseudo-réplicas para a determinação dos valores de bootstrap.

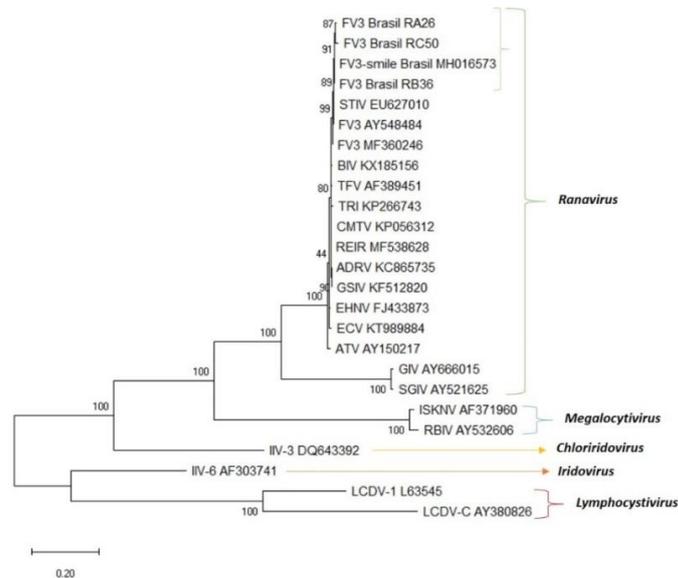
**Tabela 1:** *Primers* utilizados nas reações da PCR.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Sentido	Produto pb / nome região
ORF53R F1	ATGGGAGCAGCGGAATCTA	senso	530
ORF53R R2	ATCTGGGACACAATGTCCCT	antisenso	MMP1
ORF53R F2	TGAGGGGAACAATCTCTGCT	senso	440
ORF53R R1	TTAACCCCTGTGGGCCGG	antisenso	MMP2

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A clonagem do gene MMP (ORF53R) do FV3-símile possibilitou a comparação deste gene entre 16 cepas do gênero *Ranavirus*, indicando que se trata de um gene conservado, principalmente em sua porção inicial, permitindo a utilização da região MMP1 em estudos de monitoramento laboratorial para ranavirioses. O diagnóstico de *Ranavirus* nas amostras analisadas foi eficiente, utilizando-se os dois fragmentos do gene MMP, apresentando os mesmos resultados aos encontrados com o fragmento do gene MCP (MCP2).

As sequências nucleotídicas para a MMP1 e MCP2 apresentaram, em média, 98% e 100% de identidade com o FV3, respectivamente, evidenciando-se mais uma vez a ocorrência de FV3 em rãs-touro no Brasil. A análise filogenética, baseada em concatâmeros de 1155pb (MCP2 e MMP1), indicou que as amostras brasileiras estão agrupadas no clado de *Ranavirus* (Figura 1), sendo que o perfil obtido da árvore, considerando a família *Iridoviridae*, corrobora com aquele verificado em outros estudos descritos na literatura.



**Figura 1:** Árvore filogenética da família *Iridoviridae*, a partir de concatâmeros MCP2/MMP1.

## CONCLUSÃO

O marcador molecular baseado na sequência nucleotídica codificante para a proteína MMP se mostrou eficaz para o diagnóstico laboratorial de *Ranavirus*, bem como para uso em reconstruções filogenéticas de iridovírus, sendo alternativa viável para o monitoramento da ocorrência de *Ranavirus* em criações comerciais de anfíbios.

## REFERÊNCIAS

- CHINCHAR, V. G.; HICK, P.; INCE, I.A.; JANCOVICH J.K.; MARSCHANG, R.; QIN, Q.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T.B.; WHITTINGTON, R.; WILLIAMS, T. ZHANG, Q.; ICTV Report Consortium. 2017 ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, London, 98:890-891.
- MARSH, I. B.; WHITTINGTON, R.J.; O'ROURKE, B.; HYATT, A. D.; CHISHOLM, O. 2002. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on

variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular and Cellular Probes*, London, 16(2):137-151.

WHITLEY, D.S.; YU, K.; SAMPLE, R.C.; SINNING, A.; HENEGAR, J.; NORCROSS, E.; CHINCHAR, V.G. 2010 Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication *in vitro*. *Virology*, Waltham, 404:448-456.